

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-126074

(43)Date of publication of application : 27.04.1992

(51)Int.Cl.

C12N 5/06

C12M 3/00

(21)Application number : 02-242449

(71)Applicant : BIO MATERIAL KENKYUSHO:KK

(22)Date of filing : 14.09.1990

(72)Inventor : WATANABE YOSHIAKI

(54) SUBSTRATE FOR CULTURE OF TISSUE CELL

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a culture substrate for tissue cell enabling the culture in a state close to the culture in vivo by forming regions composed of a polysaccharide and having different cell specificities on a plastic substrate using the technique of photo-lithography.

CONSTITUTION: A pattern of a photo-resist is formed on a plastic substrate such as polysulfone, polyether sulfone, polymethylpentene and polyester. The pattern is treated with ammonia plasma and made to react with a mixed solution of a water-soluble condensation agent [e.g. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)- carbodiimide hydrochloride] and a polysaccharide containing carboxyl group. Concrete examples of the polysaccharide are heparin, chondroitin sulfate, hyaluronic acid, alginic acid and carboxyl methyl chitin. The photo-resist is removed to obtain a culture substrate for tissue cell (e.g. hepatocyte).

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

平4-126074

⑬ Int.Cl.⁹C 12 N 5/06
C 12 M 3/00

識別記号

府内整理番号

⑭ 公開 平成4年(1992)4月27日

Z

9050-4B
7236-4B

C 12 N 5/00

E

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全5頁)

⑮ 発明の名称 組織系細胞の培養用に用いる基質

⑯ 特許 平2-242449

⑰ 出願 平2(1990)9月14日

⑱ 発明者 鍋邊 芳明 神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 株式会社バイオマテリアル研究所内

⑲ 出願人 株式会社バイオマテリアル研究所 神奈川県横浜市栄区田谷町1番地

⑳ 代理人 弁理士 遠山 健一

明細書

1. 発明の名称

組織系細胞の培養用に用いる基質

2. 各種請求の範囲

(1) プラスチック基質に、フォトレジストのバーンを形成し、アンモニアブリズマ処理を行った後、水溶性粘合剤とカルボキシル基を含む多孔の膜層を形成させ、最後にフォトレジストを除去することにより製造されることを特徴とする組織系細胞の培養基質。

(2) プラスチック基質が、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリメチルベンゼンまたはポリエヌチルであることを特徴とする請求項第1項記載の組織系細胞の培養基質。

(3) 水溶性粘合剤が、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩またはN-シクロヘキシル-N'-(2-セロネリノエチル)カルボジイミドペーパートルエンスルホン酸塩であることを特徴とする請求項第1項記載の組織系細胞の培養基質。

(6) カルボキシル基を有する多糖が、ヘパリン、コンドロイキン硫酸、コンドロイチン、ヒアルロン酸、アルギン酸、カルボキシルメチルヤシタンであることを特徴とする請求項第1項記載の組織系細胞の培養基質。

3. 発明の詳細な説明

(発明上の利用分野)

本発明は、生体の組織系細胞を体外において増殖しようとする際に用いる培養基質に関するものであり、細胞が外部環境を認識し接着、増殖するという細胞の機能を生かした新規培養基質に関するものである。

(従来技術)

従来細胞とは、例えば、肝細胞、腎細胞、筋肉細胞、皮膚細胞、血管内皮細胞など生体の細胞を構成する細胞をいう。これに対してして、血漿細胞とは、浮遊状態で血漿、リンパ管内を移行する好中球、单核等をいう。組織細胞とは、血漿細胞とは異なり一定の部位に定位し、分化し、増殖を行い機能を表す。体外で培養を行う場合も同様であり、

特開平4-126074 (2)

皇液系細胞は、培養液（以下培地という）中で浮遊したまま増殖するが、組織系細胞は、接着する基質がなくては増殖してこない。

培養液に用いる基質としては、通常、カラス、或は熟練したプラスチック等をそのまままたはコートゲン、ポリジン、フィブロネクチン等をコートして使われている。これらの基質では、その表面に物質が接着し、増殖してくる。

〔発明が解決しようとする課題〕

生体内において、細胞群は、特定の配列構造をとっています、一定にたたかいでいるわけではない。それぞの組織特有の構造体となっている。この構造は、各細胞のまたは組織群の機能と密接に結びついている。これまで用いられてきた培養基質は、基質上に均等に細胞接着が起こり、生体内で細胞のおかれている状態とは異なるものである。細胞は生体外にとり出して培養し、生体内の場合と同様の働きを実現させるためには、より生体内に近い環境を与えて一度の形態なり構造体にして培養することが必要である。

この方法として種々の方法が考えられるが、坐なる均一な表面の培養基質ではなく、細胞の接着特異性の異なる複数を細胞レベルで形成することにより一定の形態を示させ得ることが可能と考えられた。また、細胞を培養する場合の基質は、非毒性であることが必須である。例えば、培養に用いる培地を調査する際に使う水もオキソ交換、逆浸透、マイクロフィルタレーションなどの方法で不純物を極力除いた純度の高いものが必須である。つまり、培養基質の場合も同様の考慮が必要である。有機成分等の溶出はいうまでもなく、細胞活性のある表面構造も避けなければならない。

そこで、本発明者は、細胞毒性の非常に少ない天然の多糖類を用いることを検討したところ高い有用性を示すことが判明した。また、前記の細胞活性の違った領域の形成には「ウォトリソグラフィー」の手法を応用することが可能であるとの知見を得た。

本発明の組織系細胞の培養に使用する培養基質は、これらの方法をさらに詳細に検討した上、完

成に至ったものである。

即ち、本発明は、組織系細胞を、従来の单一平面以上の培養に比してより生体内に近い培養を行うことができると共に、細胞活性の非常に少ない新規培養基質を提供することを目的とするものである。

〔課題を解決するための手段〕

このような目的を達成するための本発明の構成は、以下の(i)～(iv)の技術的な段階から成るものである。

(i) プラスチック基質に、フォトレジストのバターンを形成し、アソニニアアラズマ燃焼を行った後、水溶性結合剤とカルボキシル基を含む多糖の複数を反応させ、最後にフォトレジストを除去することにより製造されることを前段とする組織系細胞の培養基質。

(ii) プラスチック基質が、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリメチルベンゼンまたはポリエチルであることを前段とする前記(i)記載の組織系細胞の培養基質。

(iii) 水溶性結合剤が、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩またはN-シクロヘキシル-N'-(2-モルホリノエチル)カルボジイミド-バラートルエシス酸塩であることを前段とする前記(i)記載の組織系細胞の培養基質。

(iv)カルボキシル基を有する多糖が、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、ヒアルurons、アルギン酸、カルボキシルメチルホチコンであることを前段とする前記(ii)記載の組織系細胞の培養基質。

本発明において、使用されるプラスチック基質は、フォトレジストをコートしてバターン形成することができる材質であればいずれのばく引いてもよいが、フォトレジスト液に含まれる溶剤に対する耐溶剤性、レジストを乾燥する際に必要となる熱に対する耐熱性等が必要である。また、細胞を培養した状態で細胞活性化することができるという観点から透明性の高いものが好ましい。このようなことから、ポリエーテルスルホン、ポ

特開平4-126074(3)

リスルオノ、ギリメチルベンゼン、ポリエチル等が好みしい。思状は、フォトレジストをコートする点、細胞を培養する点から、シート状態、フィルム状態が好みしい。厚さは、特に指定されるものではないが、取扱い易さから5.0～10.0μm程度が好適である。

フォトレジストは、半導体基板作製用に使われている高解像度のものがすべて使用されるが、ボジットフォトレジストであるノボロッターブラズマノン型が使い易く、かつ各社から多数组が市販されている点で評価できるが、プラスチック基質の耐溶剤性を考慮してより適切なものを使用すればよい。

パターンの形状、幅、長さは、特に固定されるものではないが、招紙系細胞の細胞間相互作用による機能免観を考慮に入れるならば、一部細胞密度の大きさでは不適当である。数十～数百μmが適当である。

フォトレジストは、スピンナー法によりコートして、市販の露光装置を用いて所定のパターンを

形成する。露バーン器を除去ベーリングを行って、フォトレジストのパターンを形成する。各条件はレジスト種により異なるため、それぞれの至適条件で行う。フォトレジストのパターンを形成したプラスチック基質にアンモニアの低温アラズマ処理を行いプラスチック基質表面にアミノ基を導入する。アラズマ処理の条件は、0.01Torr程度に減圧したチャンバー内にアンモニアガスを導入し、0.05～0.5Torrの圧力にして、5～100Wの電力となるように露圧を印加し、3.1～5分処理する。13.56MHzの高周波を用いることが望ましい。なお、アラズマ処理装置の種類、電圧周波数、チャンバーの大ささ等により特性が異なるため適切な条件を選んで行えばよい。

次に、この処理基質を水溶性結合剤とカルボキシル基を含む多糖の混合液で反応させる。水溶性結合剤は0.5～10%、カルボキシル基を含む多糖は0.1～5%が好適である。4℃～室温の温度で、10～20時間反応させる。水溶性結合剤としては、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノ)プロピ

ル》カルボジイミド塗装液、またはN-エクリオヘキサル-N'-(2-メチルホリノエチル)カルボジイミドバラースメヌスルホン酸塗が好適である。カルボキシル基を含む多糖は、天然物、合成物等様々なもののが知られている。細胞に有害な作用を与えないもののが良いのは当然であるが、不純物を多く含むものや作用が不明確なものは不適当である。

また、細胞に対する効率的な後着、非接着の作用を持たないものも不適である。なぜならば、細胞に対して特異性の違った研磨を作り出すことができないからである。以上の点からカルボキシル基を含む多糖として、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、ヒアルロン酸、アルギン酸、カルボキシルテカルキチンが好適である。反応が終了したら、最後にフォトレジストの除去を行うために、エクノールまたはメタノール中に上記基質を浸漬し、超音波洗浄を行う。1～5回洗浄した後、純水でリinzする。このようにして調製した基質はそのリソーム基質液中で安定に

保存することができる。

実施例1
プラスチック基質として、100μm厚さの10cm×10cmのフィルムを用いた。材質は、ポリエチルスルホン、ポリスルホン(いずれも住友ベークライト社製)の2種を用いた。

このプラスチック基質に、ボジットフォトレジストOPPA-5000(東京化工業社製)をスピンナー法により膜厚1.5μmにコートした。露光装置NSK-1500SA(ニコン社製)を用いて、露径50μmの円形、パターンをフォトマスクで露光し成形した。露光時間は、150ms、露光液XWB-7(東京化工業社製)で露後洗浄、80℃で20分間乾燥した。この基質をアラズマ装置(サムコ社製PB-10S)を用いてアンモニアアラズマ処理した。0.01Torrに露圧後、アンモニアスズを導入し、0.2Torrに露圧後、2分処理した。

次に、この基質を、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノ)プロピル)カルボジイミド塗装液10%水溶液とヘパリン、ヒアルロン酸、カルボキシ

特開平4-126074(4)

メチルテキンの20%水溶液を、それぞれ混和した水溶液と反応させた。4で18時間反応後、純水で洗浄。そして、エタノール中に浸漬し、超音波洗浄を1回／2分で、2回行った。純水で洗浄後に、リン酸緩衝液中に保存した。

1は角に上記フィルムを切ったサンプル片を12ケルブレートに入れて細胞系細胞の培養を行った。細胞は繊維の細胞であるH4TC（ラット由来）を用い、 5×10^3 個／孔の細胞濃度の液を1ml／ケル入え1週間増殖した。培養は中性に調節したDMEM（日本製薬社製）にグルタミン（日本製薬社製）を0.3g/L、半胱氨酸0.1%、胎血清10%となるよう加えたものを使用した。

培養2日目には、いずれの条件で調製した基質でも、形成したパターンと同じ形態をとっていることが観察された。さらに7日目には、立体的な構造が二次元のパターンで形成されていることがみとめられ、生体内に近い培養環境となっていることが認められた。

実施例2

プラスチック基質にコロナ放電処理したポリメチルベンゼン（三井石油化学社製）、ポリエチレン（東レ社製）を用い、水溶性総合剤は、N-シアクロヘキシル-N'-(2-モルホリカルボジイミド-バタ-ヒルエンスルホン酸塩を、カルボキシル基を含む多糖は、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、アルギン酸（各シグマ社製）を用いて両様の基質を調整した。半大動脈より採取した血管内皮細胞（培養3代）を、DMEM/F12培養（シグマ製）に10%となるよう半胱氨酸を添加した培地で実施例1と同様に培養したところいずれの基質も多糖により形成された形態どちらに細胞が培養されていることが認められた。

(発明の効果)

本発明の基質を用いて組織系細胞の培養を行うと、その細胞の細胞形態が明瞭に制御される。

従来の单一平面上の培養に比べてより生体内に近い培養を行うことができ、細胞の機能研究、あるいは分化の誘導、形状形成等に非常に有用なものであり、産業上の利便性も大きなものがある。

以下、実施例により本発明とさらに具体的に範囲する。

弁理士 達山 勝一

平成補正書

平成3年6月10日

特許庁長官 植松敏毅

1. 事件の表示

特願平2-242443号

2. 発明の名称

組織系細胞の培養に用いる基質

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

横浜市栄区田舎町1番
株式会社バイオマテリアル研究所
代表取締役 中原 信

4. 代理人
〒105 東京都港区虎ノ門1丁目9-10
虎ノ門ビル TEL 508-0876
(6945) 弁理士 達山 勝一

5. 補正命令の日付

平成3年5月14日（発送日）

6. 補正の対象

代理権を認めた並びに明示的

6. 補正の内容

別紙の通り

3.10
—
—

(別紙)

明細書中、誤字がありましたので下記の通り補正します。

2. 特許請求の範囲

(1) プラスチック基質に、フォトレジストのパターンを形成し、アンモニアプラズマ処理を行った後、水溶性粘合剤とカルボキシル基を含む多糖の混液を反応させ、最後にフォトレジストを除去することにより製造されることを特徴とする組織系細胞の培養基質。

(2) プラスチック基質が、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリメチルベンゼンまたはポリエチルであることを特徴とする請求項第1項記載の組織系細胞の培養基質。

(3) 水溶性粘合剤が、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピロ)カルボジイミド塩酸塩またはN-シクロヘキシル-N'-(2-モルホリノエチル)カルボジイミド-ペラートニエンスルホン酸塩であることを特徴とする請求項第1項記載の組織系細胞の培養基質。

(4) カルボキシル基を有する多糖が、ヘパリン、

ヌ酢塩¹を「カルボジイミド-ペラートリエンスルホン酸塩」と訂正。

同頁5行、10行「前記(1)記載」を「前記(1) 補記載」と訂正。

第7頁8行「すべて使用されるか」を「すべて使用できるが」と訂正。

第10頁1行「露光し成形し」を「露光し形成し」と訂正。

第11頁8行「肝臓の細胞である。H4T1G」を「肝臓の細胞である。H4T1G」と訂正。

同頁下から1行「～へな塊が」を「～へな細胞塊が」と訂正。

第12頁4行「(2-モルホリ/カルボジイミド～」を「(2-モルホリ/エチルカルボジイミド～」と訂正。

同9行「DM6E/F12」を「DMEM/F12」と訂正。

第13頁1行～2行「以下、実施例により本発明とさらに具体的に説明する。」を削除します。

特開平4-126074(5)

コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、ヒアルロン酸、アルギン酸、カルボキシルメチルアセテインであることを特徴とする請求項第1項記載の組織系細胞の培養基質。

2頁14行「組織細胞とは、」を「組織系細胞」に訂正。

2頁15行「血管肉皮細胞」を「血管肉皮細胞」と訂正。

同頁14行「組織細胞とは、」を「組織系細胞」に訂正。

同頁下から3行～2行「組織細胞は血液細胞とは異なり一定の成熟に定在し、分化し、増殖」を「組織系細胞は血液系細胞とは異なり一定の部位に定在し、分化、増殖」と訂正。

明細書第8頁4行「通常、カラス」を「通常、ガラス」と訂正。

同頁下から3行「働きを殺させるためには、」を「働きを破壊させるためには、」と訂正。

第5頁下から2行「前記(1)記載の」を「前記(1) 補記載の」に訂正。

第6頁4行「カルボジイミド-ペラートルエン